

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-164295

(43)Date of publication of application : 10.06.2003

(51)Int.CI.

C12N 15/09
C12N 1/19
// (C12N 1/19
C12R 1:85)

(21)Application number : 2002-128323

(71)Applicant : TOYOTA MOTOR CORP
TOYOTA CENTRAL RES & DEV LAB INC

(22)Date of filing : 30.04.2002

(72)Inventor : SAITO SATOSHI
SAOTOME OSAMU
HOYA NORIKO
MATSUO YASUO
ISHIDA NOBUHIRO
HIRAI MASAKATA
KITAMOTO KATSUHIKO

(30)Priority

Priority number : 2001286637 Priority date : 20.09.2001 Priority country : JP

(54) SYSTEM ENABLING HIGH EXPRESSION OF GENE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for stably transferring a target gene into a host organism and expressing the gene at a high rate.

SOLUTION: A target gene to be expressed is connected to a pyruvic acid decarboxylase 1 promoter in a yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the product is transferred into the genome of a host to effect the stable expression of the target gene at a high expression rate. In other words, the invention relates to a genetic fermentation method comprising the transfer of the target gene into a genome under the control of the promoter of a gene having an autoregulation mechanism or the promoter of a gene non-essential to the growth or fermentation of the host organism. The promoter may be a DNA having a promoter activity and containing a base sequence of the above promoter wherein 1-40 bases are deleted, substituted, or added, or a DNA having a promoter activity and hybridizable with a DNA having a sequence complementary to the whole or a part of the base sequence of the above promoter under stringent condition.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.03.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or the gene expression approach characterized by introducing the purpose gene into growth or fermentation in a host organism at a genome under control of the promotor of the gene which is not indispensable.

[Claim 2] The gene expression approach according to claim 1 that a promotor is DNA in which 1-40 bases have promotor activity in the base sequence of the promotor of the gene which is not indispensable to growth or fermentation in the base sequence of the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or a host organism, including deletion and the array permuted or added.

[Claim 3] The gene expression approach according to claim 1 which is DNA in which a promotor hybridizes under the base sequence of the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or DNA to which it becomes the array of all or a part of base sequences of the promotor of the gene which is not indispensable to growth or fermentation from a complementary array in a host organism and stringent conditions, and has promotor activity.

[Claim 4] The gene expression approach according to claim 1 to 3 that the promotor of the gene in which an auto regulation device exists is a promotor of pyruvate decarboxylase 1 gene.

[Claim 5] The gene expression approach according to claim 1 to 3 which is the promotor of the gene to which the promotor of the gene which is not indispensable does the code of the thioredoxin to growth.

[Claim 6] The gene expression approach according to claim 1 to 5 that a host organism is bacteria, yeast, an insect, an animal, or vegetation.

[Claim 7] The gene expression approach according to claim 6 which is that to which yeast belongs to *Saccharomyces*.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention uses the gene engineering-technique for a host organism, and relates to the approach of introducing a gene and making it discover.

[0002]

[Description of the Prior Art] When performing matter production or performing an alteration or analysis of a host organism of a function in a host organism, the gene engineering-technique which introduces congener or a heterologous gene into a host organism, and it is made to discover is used. However, still, this gene engineering-technique is not enough stability and in respect of a high manifestation, and an improvement is desired.

[0003] For example, when a host organism is yeast *Saccharomyces cervisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*), the YEP type vector using 2micrometer DNA is used well. Although many YEP vectors can introduce the gene of a copy, since the enzyme activity may fall according to omission of a vector etc. in connection with cell division, they cannot say that it is enough in respect of stability. [whether in order to raise enzyme activity, these drugs are added to a culture medium by making a vector contain a drug resistance marker, and] Or although selective pressure can be applied by using the minimal medium (YNB, product made from Difco) which designed so that an auxotroph marker might be included in a vector, and was further refined to altitude as a culture medium when the auxotroph marker is beforehand given to the host stock Culture-medium cost has the trouble of becoming a large sum, also about which case.

[0004] On the other hand, the YIP vector using homologous recombination is known as a chromosome installation mold vector. Although this YIP vector can make an introductory gene exist on a genome stably depending on the design of a vector, it cannot make an introductory gene high-discover generally. Since it was above, in this technical field, the gene was introduced into the host organism by low cost, and stable and the approach of making it high-discover were desired.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention aims at introducing the purpose gene into a host organism stably, and offering the approach of making it high-discover.

[0006]

[Means for Solving the Problem] this invention persons came to complete a header and this invention for this purpose gene being made to high-discover stably by connecting the purpose gene [pyruvate decarboxylase 1 promotor in yeast *Saccharomyces cervisiae*] making it discover, and introducing this into a host's genome, as a result of inquiring wholeheartedly, in order to solve the above-mentioned technical problem.

[0007] That is, this invention is the gene expression approach characterized by introducing the purpose gene into growth or fermentation at a genome under control of the promotor of the gene which is not indispensable in the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or a host organism. The above-mentioned promotor may be DNA in which 1-40 bases have promotor activity, including deletion and the array permuted or added in the base sequence of the promotor of the gene which is not indispensable to growth or fermentation in the base sequence of the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or a host organism. Moreover, the above-mentioned promotor may be DNA which hybridizes under the base sequence of the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or DNA which becomes the array of all or a part of base sequences of the promotor of the gene which is not indispensable to growth or fermentation from a complementary array in a host organism and stringent conditions, and has promotor activity.

[0008] In this invention, as a promotor of the gene in which the above-mentioned auto regulation device exists, the promotor of pyruvate decarboxylase 1 gene is mentioned and the promotor of the gene which carries out the code of the thioredoxin to growth as a promotor of the gene which is not indispensable is mentioned. In this case, any of bacteria, yeast, an insect, an animal, or vegetation are sufficient as a host organism, and its yeast belonging to especially *Saccharomyces* is desirable. These host organisms mean both the bion (except for *Homo sapiens*) an organization and a cell.

[0009]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, this invention is explained to a detail. In living world, the gene in which an auto regulation device exists, and the gene which is not indispensable to growth and fermentation exist. This invention persons chose the promotor of such a gene in installation and the manifestation approach of a gene paying attention to this point. Therefore, the gene expression approach of this invention is characterized by introducing the purpose gene into growth or fermentation at a genome under control of the promotor of the gene which is not indispensable in the bottom of control of the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or a host organism. The outline of the approach of this invention is as follows.

[0010] 1. Choose the promotor of the gene which is not indispensable as growth or fermentation of a promotor's selection *****, the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or a host organism. As a target host organism, all the living things expected matter production and a functional alteration, or a functional analysis can be used as a host organism. For example, bacteria, yeast, an insect, an animal, or vegetation is mentioned.

[0011] (1) In order to choose the promotor of the gene in which the gene promotor auto regulation device in which an auto regulation device exists exists, specify first the gene in which an auto regulation device exists. Although two or more genes which have the same function as an "auto regulation device" existed in the same living thing and at least one of them is usually discovered, the remaining genes are controlled, and only when the usually discovered gene stops functioning by destruction etc., they mean the device which the remaining genes are discovered and continues the function. For example, the pyruvate decarboxylase gene (PDC) of the yeast belonging to *Saccharomyces* is a gene which carries out the code of the enzyme which carries out the decarboxylation of the pyruvic acid and changes it into an acetaldehyde in the process in which ethanol is produced, and has played the important role in the fermentation process. Although PDC1, PDC5, and PDC6 exist in PDC, PDC1 is usually functioning and PDC5 and PDC6 are controlled by work of PDC1. However, when the variation by gene disruption or drugs is given to this PDC1 and the function of PDC1 is made to inactivate, PDC5 gene is activated and, thereby, the ethanol production function of yeast is not lost. That is, a physiological expression system becomes almost equivalent to an old stock.

[0012] The gene in which an auto regulation device exists can be specified by checking whether the protein which is a gene product is still discovered in the stock which destroyed a certain gene. Thus, the promotor of the gene in which the specified auto regulation device exists is chosen. In this invention, the promotor (it is hereafter called PDC1 promotor.) of PDC1 can be chosen, for example.

[0013] (2) In order to choose the promotor of the gene which is not indispensable as the growth or fermentation of a promotor host organism of the gene which is not indispensable to growth or fermentation, specify first the gene which is not indispensable as growth or fermentation. Here, "growth" means surviving so that a fungus body can be increased, and "fermentation" means producing matter, such as alcoholic fermentation. And even if it destroys or inactivates the gene concerned, growth, fermentation, or these both are still maintained, and "the gene which is not indispensable" means an unrelated gene as these growth and fermentation.

[0014] The gene which is not indispensable to growth or fermentation can be specified by checking whether a host organism continues growth and fermentation in the stock which destroyed a certain gene. TRX1 gene which carries out the code of the thioredoxin which exists in most living things as such a gene, for example is mentioned. Although this TRX1 gene is participating in DNA replication, an oxidative stress response, vacuole heredity, etc., it is not necessarily indispensable to growth or fermentation. That is, even if it sets to a host organism and destroys or permutes TRX1 gene, a host organism can continue growth or fermentation. Thus, the promotor of the gene which is not indispensable is chosen as the specified growth or fermentation of a host organism.

[0015] 2. Prepare the promotor and the purpose gene which are introduced into the purpose gene and a promotor's preparation host organism and which made [above-mentioned] selection. In this invention, the "purpose gene" may mean the gene expected to make it discovered for matter production and a functional alteration, or a functional analysis, and any of a gene of the same kind or a heterologous gene are sufficient as it. For example, when aiming at matter production, the gene which carries out the code of the protein useful as a purpose gene is desirable, and interferon, a vaccine, hormone, etc. are mentioned as such useful protein, for example. Moreover, the purpose gene may be a gene which carries out the code of the enzyme, for example, the gene which carries out the code of the lactate dehydrogenase which generates a lactic acid from a pyruvic acid is mentioned.

[0016] Preparation of the purpose gene and the above-mentioned promotor can adopt the technique of well-known arbitration by this technical field. For example, when isolating the purpose gene and the above-mentioned promotor from the source of supply, it can prepare by the approach of compounding RNA to cDNA prepared by the guanidine isothiocyanate method. Moreover, it is also possible to prepare by amplifying genomic DNA as mold by PCR. Thus, DNA of the purpose gene and the above-mentioned promotor who got can be used by digesting by remaining as it is for the purpose, and digesting it with a restriction enzyme by request, or adding a linker.

[0017] In this invention, DNA in which 1-40 bases have promotor activity, including deletion and the array permuted or added is also available as a promotor in a promotor's base sequence. When promotor activity

connects the purpose gene in the condition which can be discovered on a promotor's lower stream of a river and introduces it into a host, it means having the capacity and the function to make the gene product of the purpose gene produce in a host and out of a host. Such DNA says that the promotor activity which is extent in which the almost same use is possible is maintained on the same conditions as the conditions as which the promotor who consists of a base sequence of the perfect length who does not have variation (deletion, a permutation, or addition) functions. For example, it is DNA of the promotor activity of an array of perfect length which maintains about 0.5 to 2 twice as many activity as this more preferably about 0.5 to 20 times about 0.01 to 100 times.

[0018] Such DNA can be manufactured according to the publication of reference, such as Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Lab. Press edited (1989) by Sambrook, New York). For example, the variant from which an array differs is producible with the base sequence of the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or the technique, for example, a site-directed-mutagenesis method, of carrying out artificially deletion of 1–40 bases, permutation, or addition to growth or fermentation from the base sequence concerned in a host organism based on the base sequence of the promotor of the gene which is not indispensable, maintaining promotor activity. for example, about site directed mutagenesis by which 1–40 bases are permuted

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81 (1984) 5662–5666; WO 85/No. 00817 official report; Nature 316 (1985) 601–605; Gene 34 (1985) 315–323; Nucleic Acids Res. 13 (1985) 4431–4442 ;P According to the technique of a publication, a variant is acquired in USA 79 (1982) 6409–6413; Science 224 (1984) 1431–1433 grade. Proc.Natl.Acad.Sci. — This can be used. Moreover, these variants are producible using a commercial kit (Mutan-G, Mutan-K (TAKARA SHUZO)). Furthermore, a lifting and cone polymerase chain reaction (error-prone PCR) are also known as the variant production approach in the error. By choosing low conditions whenever [of a duplicate] strict The variation of a 1 – number base It can introduce (it Cadwell(s)). R. C. and Joyce and G.F. PCR Methods and Applications 2 (1992) 28–33; Malboeuf, C. M. et al. Biotechniques 30 (2001) 1074–8; Moore, G.L. and Maranas C.D.J.Theor.Biol.7; 205 (2000) 483–503.

[0019] Moreover, the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, Or by making growth or fermentation hybridize under stringent conditions in a host organism to all or a part of a promotor's base sequences of the gene which is not indispensable, using DNA which consists of a complementary array as a probe (100 to 900 base) DNA which becomes growth or fermentation from the base sequence of the promotor of the gene which is not indispensable in the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or a host organism, and DNA which consists of other base sequences which have the same function (namely, promotor activity) are newly acquired. It can also use. Here, for example, sodium concentration is 20–100mM preferably ten to 300 mM, and stringent conditions mean conditions [in / preferably / 25–70 degrees C / in temperature / 42–55 degrees C].

[0020] It can check by the following technique whether DNA obtained by the variant acquired as mentioned above and hybridization has the activity as a promotor. That is, the promotor activity of DNA obtained as mentioned above can be checked by measuring the manifestation of the reporter gene concerned, after producing the vector which connected desirable various reporter genes (LUC), for example, a luciferase gene, the chloramphenicol acetyltransferase gene (CAT), the beta galactosidase gene (GAL), etc. with a promotor's down-stream region and introducing into a host's genome using the vector concerned.

[0021] 3. Destroy the gene which is not indispensable to growth or fermentation in installation of the purpose gene and a promotor then the gene in which the above-mentioned auto regulation device exists, or a host organism, and introduce the purpose gene into the bottom of control of the promotor of this gene, or permute this gene by the purpose gene.

[0022] For example, the promotor who made [above-mentioned] selection with the purpose gene isolated as mentioned above is connected in the form in which a function is possible, and it introduces into the genome of a host organism. It means connecting the purpose gene and the above-mentioned promotor so that the purpose gene may be discovered under the above-mentioned promotor's control in the host organism into which the purpose gene "connected in the form in which a function is possible" is introduced. Installation of the purpose gene and the above-mentioned promotor can be performed using all well-known technique by this technical field. For example, the purpose gene and the above-mentioned promotor can be introduced into the genome of a host organism using a recombination vector. A recombination vector can be obtained by connecting the purpose gene and the above-mentioned promotor with a suitable vector (insertion). Especially if the inclusion to the genome in a host organism is possible for the vector for inserting the purpose gene, it will not be limited, for example, plasmid DNA, Bacteriophage DNA, the retro transposon DNA, a yeast artificial chromosome DNA (YAC:yeast artificial chromosome), etc. are mentioned.

[0023] Plasmid As DNA, for example YIp mold Escherichia coli–yeast shuttle vectors, such as pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pAUR101, or pAUR135, the plasmid (pBR322, pBR325, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, and pTV — 118 N) of the Escherichia coli origin ColE system plasmids, such as pTV119N, pBluescript, pHSG298 and pHSG396, or pTrc99A, p15A system plasmids, such as pACYC177 or pACYC184, pSC101 system plasmids, such as pMW118, pMW119, pMW218, or pMW219 etc., The plasmid (for example, pUB110, pTP5 grade) of the Bacillus-*subtilis* origin etc. is mentioned. As phage DNA, lambda phage (Charon4A, Charon21A, EMBL3 and EMBL4,

lambdaDgt10, lambdaDgt11, lambdaZAP), a phi-X one-seven four, M13mp18, or M13mp19 is mentioned. Ty factor etc. is mentioned as retro transposon. pYACC2 etc. is mentioned as a vector for YAC. In order to insert the purpose gene and the above-mentioned promotor in a vector, a suitable restriction enzyme cuts DNA refined first, and it is a suitable vector. The approach of inserting in the restriction enzyme part or multi-cloning site of DNA, and connecting with a vector etc. is adopted.

[0024] The purpose gene needs to be included in a vector so that the function of the gene may be demonstrated under a promotor's control by which selection was made [above-mentioned]. So, cis-elements, such as an enhancer, a splicing signal, a poly A addition signal, a ribosome junction sequence (Shine Dalgarno sequence), etc. can be connected with a recombination vector by request besides the promotor and the purpose gene by which selection was made [above-mentioned], and a terminator. Moreover, the selective marker in which it is shown that the vector is held intracellular may be connected. In addition, as a selective marker, a dihydrofolate reductase gene, an ampicillin resistance gene, a neomycin resistance gene, etc. are mentioned, for example. In addition, although a tryptophan synthetic gene (TRP1 gene) is mentioned as a marker gene, it is not limited to these and other marker genes, for example, URA3 gene with a nutrition military requirement, ADE2 gene, HIS3 gene, or G418 resistance gene with drug tolerance ability is also available.

[0025] As a terminator array, although the terminator gene of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) is mentioned, this invention is not limited to this, and as long as it is an usable terminator array within a host organism, it may use what kind of thing.

[0026] It can rearrange so that the purpose gene expression [in / as mentioned above / a host organism] may be suited, and a vector can be produced. The purpose gene can be made to discover under control of the promotor who made [above-mentioned] selection in the host organism by carrying out the transformation of the host organism using this recombination vector.

[0027] When making bacteria, such as Escherichia coli, into a host, while a recombination vector can replicate autonomously in these bacteria, it is desirable to be constituted by the promotor, the ribosome junction sequence, the purpose gene, and the conclusion array of an imprint. Moreover, the gene which controls a promotor may be contained.

[0028] As Escherichia coli, ESSHIERIHIA KORI (Escherichia coli) K12 and DH1 etc. is mentioned, for example, and bacillus Subtilis (Bacillus subtilis) etc. is mentioned as a Bacillus subtilis, for example. It will not be limited especially if it is the approach of introducing DNA into bacteria as the introductory approach of the recombination vector to bacteria. For example, an approach, the electroporation method, etc. using calcium ion are mentioned.

[0029] When making yeast into a host, Saccharomyces cerevisiae (Saccharomycescerevisiae), Schizosaccharomyces POMBE (Schizosaccharomyces pombe), Pichia pasotoris (Pichia pastoris), etc. are used. Especially if it is the approach of introducing DNA into yeast as the introductory approach of the recombination vector to yeast, it will not be limited, for example, the electroporation method, the spheroplast method, the acetic-acid lithium method, etc. are mentioned.

[0030] When making an insect or an animal into a host, as the introductory approach of a recombination vector, a calcium phosphate method, the RIPOFE cushion method, the electroporation method, etc. are used, for example. the case where vegetation is made into a host — as the introductory approach of a recombination vector — for example, the Agrobacterium method and party Kurgan — law and PEG — law, the electroporation method, etc. are used.

[0031] When making the individual of an insect, an animal (except for Homo sapiens), or vegetation into a host, according to the production technique of a well-known transgenic animal or vegetation, it can rearrange by this technical field, and a vector can be introduced. For example, as the introductory approach of the recombination vector to an animal individual, the microinjection method to a fertilized egg, the approach of introducing to an embryonic stem cell, the approach of introducing into a fertilized egg the nucleus introduced to the cultured cell by the nuclear transplantation, etc. are mentioned.

[0032] The host organism which introduced the recombination vector as mentioned above chooses about the stock with which the purpose gene is introduced into the bottom of a promotor's control by which selection was made [above-mentioned]. The above-mentioned selective marker is made into an index, and, specifically, the transformant is chosen. the check of whether the purpose gene was included in the bottom of the above-mentioned promotor control — PCR (polymerase chain reaction) — it can carry out by law and the Southern hybridization method. For example, DNA is prepared from the transformant, an introductory DNA specific primer is designed, and PCR is performed. Then, Installation DNA can be checked by detecting a magnification product as one band by performing agarose gel electrophoresis, polyacrylamide gel electrophoresis, or capillary electrophoresis about a magnification product, and an ethidium bromide, SYBR Green liquid, etc. dyeing. Moreover, PCR can be performed using the primer which carried out the indicator by the fluorochrome etc. beforehand, and a magnification product can also be detected. Furthermore, a magnification product can be combined with solid phase, such as a microplate, and the approach of checking a magnification product by fluorescence or the enzyme reaction can also be adopted.

[0033] The purpose gene is introduced into the bottom of control of the promotor of the gene which is not indispensable to growth or fermentation of the promotor of the gene in which an auto regulation device exists as mentioned above, or a host organism at a genome (genome integration), and the purpose gene is discovered in a host organism. Since PDC1 promotor is a very powerful promotor, when PDC1 promotor is chosen, it will be highly-discovered even if the purpose gene is introduced into a genome by the single copy. Moreover, since the selected promotor's original gene is not indispensable to growth and fermentation, even if it permutes by destruction or the purpose gene, a host organism can continue growth and fermentation and can discover the purpose gene over a long period of time.

[0034]

[Example] Although an example is hung up over below and this invention is explained to it in more detail, this invention is not limited to these.

[Example 1] In construction this example of a vector, the lactate dehydrogenase gene (LDH gene) of the *Bifidobacterium longum* (*Bifidobacterium longum*) origin was used as a purpose gene under control of the pyruvate decarboxylase 1 gene (PDC1 gene) promotor array of the *Saccharomyces cervisiae* origin.

[0035] The newly because of this example built chromosome installation mold vector is named pBTRP-PDC1-LDH, and the detail of this example of vector construction is described below. In addition, the outline of this example is shown in drawing 1. However, the procedure of vector construction is not limited to this. Promotor fragment (PDC1P) 971bp of PDC1 gene which is a required gene fragment, and PDC1 gene downstream region fragment (PDC1D) 518bp are *Saccharomyces cervisiae* in construction of a vector. It isolated by the PCR amplifying method which used the genomic DNA of a YPH stock (Stratagene) as mold.

[0036] *Saccharomyces cervisiae* The genomic DNA of a YPH stock was prepared according to the attached protocol using Fast DNA Kit (101 company of Bio(s)) which is a genome preparation kit for details. DNA concentration was measured with the spectrophotometer Ultro spec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech).

[0037] Pyrobest DNA polymerase (TAKARA SHUZO CO., LTD.) made high [the accuracy of a magnification fragment] as a magnification enzyme was used for the PCR reaction. *Saccharomyces cervisiae* prepared by the above-mentioned technique Genomic DNA of a YPH stock 50ng / sample, primer DNA 50pmol / sample, and the Pyrobest DNA polymerase 0.2 unit / sample were prepared to the system of reaction of 50microl in total. The PCR amplifying device Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems) performed DNA magnification for the reaction solution. The reaction condition of an PCR amplifying device made 96-degree C (96 degree-C 30 second → 55 degree-C 30 second → 72 degree-C 90 second) 4 degrees C 25 cycle deed and after that after 2 minutes. The gene amplification fragment was checked for the PDC1P magnification fragment and the PDC1D magnification fragment in TBE agarose gel electrophoresis 1%. In addition, the primer DNA used for the reaction is as follows [array / of this primer / DNA] using a synthetic DNA (SAWADE technology company).

[0038] magnification and the PDC1 P-LDH-U (31mer, Tm value of 58.3 degrees C) end of PDC1P fragment — a restriction enzyme BamHI site — addition: — ATA TAT GGA TCC GCG TTT ATT TAC CTA TCT C (array number 1)

— a PDC1 P-LDH-D (31mer, Tm value of 54.4 degrees C) end — a restriction enzyme EcoRI site — addition: — ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GAC TGT G (array number 2)

magnification and the PDC1 D-LDH-U (34mer, Tm value of 55.3 degrees C) end of a PDC1D fragment — a restriction enzyme XhoI site — addition: — ATA TAT CTC GAG GCC AGC TAA CTT CTT GGT CGA C (array number 3)

— a PDC1 D-LDH-D (31mer, Tm value of 54.4 degrees C) end — a restriction enzyme ApaI site — addition: — ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GAC TGT G (array number 4)

[0039] After ethanol precipitate processing refined PDC1P and PDC1D each gene amplification fragment which were acquired at the above-mentioned reaction, respectively, restriction enzyme reaction processing was performed [the PDC1P magnification fragment] for the restriction enzyme BamHI/EcoRI and PDC1D magnification fragment in restriction enzyme XhoI/ApaI. In addition, all the enzymes used for below used the thing by TAKARA SHUZO CO., LTD. Moreover, the detailed manual of single string actuation of ethanol precipitate processing and restriction enzyme processing followed Molecular Cloning A Laboratory Manual second edition (Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory press.1989).

[0040] A series of reaction actuation in construction of a vector was performed according to the general DNA sub cloning process. That is, it amplified to the pBluescriptII SK+ vector (Toyobo Co., Ltd.) which gave restriction enzyme BamHI/EcoRI (TAKARA SHUZO CO., LTD.) and phosphatase Alkaline Phosphatase (BAP and TAKARA SHUZO CO., LTD.) in the above-mentioned PCR method, and PDC1P fragment which performed restriction enzyme processing was made to connect with it by T-fourDNA Ligase reaction (drawing 1 A). T-four DNA Ligase reaction was followed for details at the attached protocol using LigaFast Rapid DNA Ligation System (pro megger company).

[0041] Next, the transformation was performed for the solution which performed the Ligation reaction to the competent cell. The competent cell was performed according to the attached protocol using 109 shares (Toyobo Co., Ltd.) of *Escherichia coli* JM for details. The obtained culture medium was bound around LB plate containing

antibiotic ampicillin 100microg/ml, and was cultivated overnight. The check according the check by the colony [colony / which was grown] PCR method using the primer DNA of an insertion fragment and the plasmid DNA preparation solution by mini PUREPPU to restriction enzyme processing was performed, and vector pBPDC1P vector made into the purpose was isolated (drawing 1 B).

[0042] Subsequently, in the pBPDC1P vector which similarly performed restriction enzyme EcoRI processing and end repair enzyme T-four DNA polymerase processing for the LDH gene fragment obtained by restriction-enzyme-EcoRI/AatII-processing and end repair enzyme T-four DNA polymerase processing pYLD1 vector built by Toyota Motor Corp., subcloning was performed by the same actuation as ****, and the pBPDC1 P-LDH I vector was produced (drawing 1 C). In addition, the pYLD1 above-mentioned vector is introduced into Escherichia coli (name : "E.coli pYLD1"), and international deposition is carried out based on Budapest Treaty as trust number FERM BP-7423 in the independent administrative agency National Institute of Advanced Industrial Science and Technology patent living thing deposition pin center, large (1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken) (original deposition day: October 26, Heisei 11 (1999)). Then, Xhol/ApaI processing of this vector was carried out, the amplified PDC1D fragment was made to connect and the pBPDC1 P-LDH II vector was produced (drawing 2 A). What carried out EcoRV processing of the pBPDC1 P-LDH II vector was made to connect with the last AatII/SspI processing and the TRP1 marker fragment obtained by carrying out T-four DNA polymerase processing for pRS404 vector (Stratagene), and the chromosome installation mold pBTRP-PDC1-LDH vector which is the last construct was built (drawing 2 R>2B).

[0043] Base sequence determination was performed for the check of the built chromosome installation mold pBTRP-PDC1-LDH vector. Using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) as base sequence analysis equipment, details, such as the method of preparation of a sample and operation of a device, followed the manual of this equipment attachment. The vector DNA used as a sample used what measured DNA concentration with the spectrophotometer Ultra spec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech), after carrying out column purification of this in GFX DNA Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech) using what was prepared with the alkali extraction method. Moreover, the YIP vector was built so that LDH (lactate DEBIDOROGENAZE) which is a lactic-acid production gene might be introduced into the bottom of PDC1 promotor control as comparison contrast.

[0044] [Example 2] After the tryptophan demand stock of 2260 shares (strain registered into a corporation and Institute for Fermentation, Osaka) of yeast IFO which is an introductory host to the host of a recombination vector cultivated at 30 degrees C by 10mlYPD culture medium till the logarithmic growth phase and performed washing by the harvest and TE buffer, it added the 0.5mlTE buffer, and 0.5ml and a 0.2M acetic-acid lithium, and performed shaking culture at 30 degrees C for 1 hour. Then, pBTRP-PDC1-LDH processed with restriction enzymes ApaI and SpeI was added.

[0045] At 30 degrees C, 150ml of polyethylene glycols 4000 was added 70% after shaking culture for 30 minutes, and the bacillus suspension of this plasmid was agitated well. After carrying out shaking culture at 30 degrees C for 1 hour, the heat shock was given for 5 minutes at 42 degrees C. After washing a fungus body, what was suspended in 200ml water was ****(ed) to the selective medium.

[0046] After isolating the obtained colony by the selective medium and obtaining a colony, the stock with which LDH is introduced into PDC1 promotor's lower stream of a river in PCR was acquired. Furthermore, sporulation was performed by the sporulation culture medium, and 2 double object-ization was performed using HOMOTA rucksack nature, and the stock with which the above-mentioned vector is introduced into both chromosome which is 2 double objects was acquired. The transformation was carried out by pBTRP-PDC1-LDH which yeast *Saccharomyces cervisiae* showed to drawing 2 , and it was checked by PCR that it had been introduced on the genome. The structure on the genome of the above-mentioned vector is shown in drawing 3 .

[0047] [an example 3] — about LDH gene expression and the check profit **** transformant of stability, it inoculated so that cell mass concentration might become 1% to a YPD liquid medium (glucose 10%), and stationary culture was performed for two days at 30 degrees C, and comparison examination was performed about the lactic-acid volume of ** vector non-introducing stock, the LDH installation stock in **YEP vector, and a **pBTRP-PDC1-LDH installation stock. This result is shown in Table 1.

[0048]

[Table 1]

LDH導入法の違いと継代培養による乳酸生産量の比較

LDH導入法	継代培養前	継代培養後
①親株 (LDH非存在)	0 %	-
②YEPベクターによるLDH導入	0.4 %	0 %
③PDC1プロモーター制御下でのLDH導入	1.0 %	1.0 %

[0049] By ** and ** which introduced LDH, the lactic acid was produced to not making a lactic acid from vector

introducing stock **. Compared with ** furthermore introduced by the YEP vector, the 2.5 times as many lactic acid as this was produced on the stock which introduced LDH into the bottom of PDC1 promotor control. Moreover, after the YPD plate performed 3 times of subculture for the purpose of checking the stability of the characteristic introduced by this approach, when PCR investigated transgenics and a lactic-acid volume, by ** which made LDH discover under PDC1 promotor control, lactic-acid production of tales doses was maintained subculture front to having stopped producing a lactic acid in system ** introduced by the YEP vector. Moreover, since it checked that it was changeless about the structure on a genome at PCR, the system which makes LDH discover under PDC1 promotor control of ** exists in stability, and it can be said that it makes a high-discover.

[050] [Example 4] In isolation this example of a PDC1 promotor array including a variation array, and the owing examples, three kinds of PDC1 promotor arrays with the array from which a number base differs were isolated, and the chromosome installation mold vector designed so that a LacZ gene might connect with the bottom of this promotor was built. Using these vectors, this gene was introduced into the same location in a chromosome 1 ***** with this promotor, and transformed yeast was produced. The beta galactosidase activity each transformed yeast was measured, and three kinds of promotor activity was compared.

[051] It sets to this example and is *Saccharomyces cervisiae*. The PDC1 promotor array was isolated by the PCR amplifying method which used as mold the genomic DNA of a pBTRP-PDC1-LDH installation stock (strain produced in the example 2), 2260 shares (strain registered into a corporation and Institute for Fermentation, Saka) of IFO(s), and a YPH stock (Stratagene). The preparation approach of the genomic DNA of each *Saccharomyces cervisiae* (a pBTRP-PDC1-LDH installation stock, 2260 shares of IFO(s), YPH stock) and the PCR amplifying method were performed by the same technique as an example 1. In addition, the base sequence the primer DNA used for the reaction is as follows.

[052] magnification and PDC1 PrFrag-U2 (32mer, Tm value of 64.4 degrees C) end of PDC1 promotor of the pBTRP-PDC1-LDH installation stock origin — a restriction enzyme SalI site — addition: — AAA TTT GTC GAC AG GGT AGC CTC CCC ATA AC (array number 5)

PDC1 PrFrag-D2 (31mer, Tm value of 61.1 degrees C) end — a restriction enzyme SalI site — addition: — TA TAT GTC GAC GAG AAT TGG GGG ATC TTT G (array number 6)

magnification and PDC1 PrFrag-U2 (32mer, Tm value of 64.4 degrees C) end of PDC1 promotor of 2260 shares IFO(s), and the YPH stock origin — a restriction enzyme SalI site — addition: — AAA TTT GTC GAC AAG GT AGC CTC CCC ATA AC (array number 5)

a PDC1 PrFrag-D (43mer, Tm value of 62.5 degrees C) end — a restriction enzyme SalI site — addition: — TT AAA GTC GAC TTT GAT TGA TTT GAC TGT ATT TTG CGT G (array number 7)

[053] [Example 5] In construction this example of the vector for beta galactosidase analysis including a variation promotor array, the vector which connected the reporter gene was built under control of three kinds of isolated PDC1 promotor arrays. The beta galactosidase gene (LacZ gene) was used as a reporter gene.

[0054] The newly because of this example built chromosome installation mold vector is named pAUR-LacZ-123PDC1, pAUR-LacZ-OC2PDC1, and pAUR-LacZ-YPHPDC1, and the detail of the example of construction of a vector is described below. In addition, the outline of this example is shown in drawing 4. However, the procedure of vector construction is not limited to this.

[0055] A series of reaction actuation in construction of a vector followed the general DNA sub cloning process. After starting pro megger company pSV-beta-Galactosidase Control Vector with the restriction enzyme and acquiring a LacZ fragment, flush end processing was carried out and the pAUR-LacZ vector was produced. In this way, SalI (TAKARA SHUZO) processing and phosphatase Alkaline Phosphatase (BAP, TAKARA SHUZO) processing were performed to the built pAUR-LacZ vector. Next, a restriction enzyme SalI (TAKARA SHUZO) performs restriction enzyme processing for three kinds of promotor arrays acquired in the example 4, i.e., pBTRP-PDC1-LDH installation stock origin PDC1 promotor, (983bp), 2260 shares of IFO(s) origin PDC1 promotor (968bp), and YPH stock origin PDC1 promotor (968bp), respectively, and it is T-four DNA Ligase in a pAUR-LacZ vector. It was made to connect by the reaction. T-four DNA Ligase The reaction was followed for details at the attached protocol using LigaFast Rapid DNA Ligation System (pro megger company).

[0056] Obtained Ligation Using the reaction solution, the transformation was performed to the competent cell and the construction vector made into the purpose by the colony PCR method was acquired. Actuation of a top Norikazu ream was performed by the same technique as an example 1.

[0057] Base sequence analysis was performed about the built vector, and the gene sequence of pBTRP-PDC1-LDH installation stock origin PDC1 promotor (983bp), 2260 shares of IFO(s) origin PDC1 promotor (968bp), and YPH stock origin PDC1 promotor (968bp) was compared. The comparison of this array is shown in drawing 5. In addition, actuation of base sequence analysis was performed by the same technique as an example 1.

[0058] The PDC1 promotor arrays (971bp) acquired in the example 1 are so-called 12 *****, and, specifically, pBTRP-PDC1-LDH installation stock origin PDC1 promotor (983bp) consists of arrays in which the restriction enzyme SalI part (GTCGAC) was added to the both ends of the promotor array of an example 1.

[0059] Moreover, 2260 shares of IFO(s) origin PDC1 promotor (968bp) The PDC1 promotor arrays acquired in

the example 1 are so-called 30 *****. Specifically The 861st guanine (G) of the promotor array of an example 1 to a cytosine (C) The 894th cytosine (C) is permuted by the thymine (T), and the 925th adenine (A) is permuted by the thymine (T), and the array (GATCCCCCAATTCTC) of 15 bases is added to 972nd henceforth.

Furthermore, it consists of arrays in which the restriction enzyme Sall part (GTCGAC) was added to the both ends of the promotor array of an example 1.

[0060] YPH stock origin PDC1 promotor (968bp) The PDC1 promotor arrays acquired in the example 1 are so-called 37 *****. Specifically The 179th cytosine (C) of the promotor array of an example 1 to a thymine (T) The 216th guanine (G) to a guanine (G) to an adenine (A) [the 214th adenine (A)] The 344th guanine (G) to a cytosine (C) to an adenine (A) [the 271st thymine (T)] The 533rd cytosine (C) to a guanine (G) to a thymine (T) [the 490th adenine (A)] The 660th guanine (G) is permuted by the cytosine (C), and the 925th adenine (A) is permuted for the 566th thymine (T) by the thymine (T) by the cytosine (C), and the array (GATCCCCCAATTCTC) of 15 bases is added to 972nd henceforth. Furthermore, it consists of arrays in which the restriction enzyme Sall part (GTCGAC) was added to the both ends of the promotor array of an example 1.

[0061] [Example 6] After cultivating in the tryptophan demand stock of 2260 shares (strain registered into a corporation and Institute for Fermentation, Osaka) of yeast IFO which is an introductory host to the host of a recombination vector at 30 degrees C by 10ml YPD culture medium till the logarithmic growth phase and performing washing by the harvest and TE buffer in it, the 0.5ml TE buffer and the 0.5ml 0.2M acetic-acid lithium were added, and shaking culture of 1 hour was performed in it at 30 degrees C. Then, pAUR-LacZ-T123PDC1P processed by restriction enzyme Bst1107I (TAKARA SHUZO), pAUR-LacZ-YPHPDC1P, and pAUR-LacZ-OC2PDC1P were added.

[0062] At 30 degrees C, the polyethylene glycol 4000 was 150microl Added 70% after shaking culture for 30 minutes, and the suspension of this plasmid was stirred well. After carrying out shaking culture of this solution at 30 degrees C for 1 hour, the heat shock was given for 5 minutes at 42 degrees C, the bacteria object was performed in 1ml YPD culture medium, and culture was performed at 30 degrees C for 12 hours. What was suspended in the sterilized water of 200microl was ****(ed) to the OLE OBACHISHIN selective medium after washing main culture liquid. Concentration of OLE OBACHISHIN added to the culture medium was carried out in 0.4microg/ml. The obtained colony isolated by the OLE OBACHISHIN selective medium, performed the PCR method to the obtained colony, and acquired the target stock.

[0063] [Example 7] Beta galactosidase activity was measured about the measurement above-mentioned transformant and the non-transformant of beta galactosidase activity in gene recombination strain. 30 degrees C and culture of 20 hours were performed for each strain by 2ml YPD liquid medium (glucose 2%). The harvest of these was carried out, 50 mM Tris-HCl 500microl and glass BISU (425-600microns Acid Washed, SIGMA company) were added, and the vortex was performed for 15 minutes at 4 degrees C.

[0064] By centrifugal, the supernatant liquid of this solution was extracted and such beta galactosidase activity measurement was measured. Activity measurement followed the attached protocol for details using beta-Galactosidase Enzyme Assay System (pro megger company). ABS600nm= --- the activity value per 1.0 is calculated and this result is shown in drawing 6 (before subculture), and drawing 7 (after subculture).

[0065] Even if it was a PDC1 promotor array with the addition array of dozens bases, or a different array, it became clear from the above result to have the stable promotor activity. Therefore, it can be said that it can use even if the promotor of the gene which is not indispensable to growth or fermentation is not perfect length in the promotor of the gene in which an auto regulation device exists, or a host organism.

[0066]

[Effect of the Invention] Stability can be made to introduce and high-discover a gene according to this invention, without affecting growth and fermentation of a host organism. Therefore, a means effective in matter production and a functional alteration, or functional analysis is offered.

[0067]

[Layout Table]

SEQUENCE-LISTING<110> Toyota Jidosha Kabushiki-Kaisha, Toyota Central R&D Labs.<120> Gene Expression-System<130> P02-0112<150> JP 2001-286637<151> 2001-09-20<160> 7 <170> PatentIn Ver. 2.0<210> 1<211> 31<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA <400> 1 atatatggat ccgcgttat ttacctatct c 31 <210> 2 <211> 31<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA <400> 2 atatatgaat tctttgattt atttgactgt g 31 <210> 3 <211> 34<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA <400> 3 atatatctcg aggcagcta acttcttggc cgac 34 <210> 4 <211> 31<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA <400> 4 atatatgaat tctttgattt atttgactgt g 31 <210> 5 <211> 32<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 5 aaatttgtcg acaagggtag cctcccccata ac 32 <210> 6 <211> 31<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 6 atatatgtcg acgagaattt gggatctt g 31 <210> 7 <211> 43<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: primer<400> 7 tttaaagtgc actttgattt atttgactgt gttatttgc gtg 43 [0068]

[Array free text]

array number 1: --- a synthetic DNA --- array number 2:synthetic DNA array number 3:synthetic DNA array
number 4: --- a synthetic DNA --- array number 5:synthetic DNA array number 6:synthetic DNA array number 7:
--- a synthetic DNA

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPPI are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the construction Fig. of chromosome installation mold vector pBTRP-PDC1-LDH.

[Drawing 2] It is the construction Fig. of chromosome installation mold vector pBTRP-PDC1-LDH.

[Drawing 3] It is drawing showing the genome structure of the stock obtained when the transformation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* is performed using vector pBTRP-PDC1-LDH.

[Drawing 4] It is the construction Fig. of chromosome installation mold vector pAUR-LacZ-T123PDC1 (A), pAUR-LacZ-OC2PDC1 (B), and pAUR-LacZ-YPHPDC1 (C).

[Drawing 5] It is drawing showing the comparison of the gene sequence of pBTRP-PDC1-LDH installation stock origin PDC1 promotor (983bp), 2260 shares of IFO(s) origin PDC1 promotor (968bp), and YPH stock origin PDC1 promotor (968bp).

[Drawing 6] It is drawing in the transformant which introduced pBTRP-PDC1-LDH installation stock origin PDC1 promotor (983bp), 2260 shares of IFO(s) origin PDC1 promotor (968bp), and YPH stock origin PDC1 promotor (968bp) showing the beta galactosidase activity in front of subculture.

[Drawing 7] It is drawing in the transformant which introduced pBTRP-PDC1-LDH installation stock origin PDC1 promotor (983bp), 2260 shares of IFO(s) origin PDC1 promotor (968bp), and YPH stock origin PDC1 promotor (968bp) showing the beta galactosidase activity after subculture.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-164295

(P2003-164295A)

(43)公開日 平成15年6月10日(2003.6.10)

(51)Int.Cl.
 C 12 N 15/09
 1/19
 // (C 12 N 1/19
 C 12 R 1:85)

識別記号
 Z N A

F I
 C 12 N 1/19
 C 12 R 1:85
 C 12 N 15/00

マークコード(参考)
 4 B 0 2 4
 4 B 0 6 5

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全15頁)

(21)出願番号 特願2002-128323(P2002-128323)
 (22)出願日 平成14年4月30日(2002.4.30)
 (31)優先権主張番号 特願2001-286637(P2001-286637)
 (32)優先日 平成13年9月20日(2001.9.20)
 (33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000003207
 トヨタ自動車株式会社
 愛知県豊田市トヨタ町1番地
 (71)出願人 000003609
 株式会社豊田中央研究所
 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
 地の1
 (72)発明者 斎藤聰志
 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動
 車株式会社内
 (74)代理人 100091096
 弁理士 平木祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子高発現系

(57)【要約】 (修正有)

【課題】宿主生物に安定的に目的遺伝子を導入し、高発現される方法を提供する。

【解決手段】酵母サッカロマイセス・セレヴィシエ中のピルビン酸デカルボキシラーゼ1プロモーターに発現させたい目的遺伝子を連結し、これを宿主のゲノムに導入することにより、該目的遺伝子を安定的に高発現させ得ることを見出した。即ちオートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーター、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須でない遺伝子のプロモーターの制御下に目的遺伝子をゲノムに導入することを特徴とする遺伝子発酵方法である。上記プロモーターの塩基配列において1~40個の塩基が欠失、置換、付加された配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNAであってよい。また上記プロモーターの塩基配列の全部若しくは一部の配列に相補的な配列からなるDNAとストリンジメント条件下でハイブリダイズするプロモーター活性を有するDNAでもよい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーター、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの制御下に目的遺伝子をゲノムに導入することを特徴とする遺伝子発現方法。

【請求項2】 プロモーターが、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターの塩基配列、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの塩基配列において1～40個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNAである、請求項1記載の遺伝子発現方法。

【請求項3】 プロモーターが、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターの塩基配列、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの塩基配列の全部若しくは一部の配列に相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロモーター活性を有するDNAである、請求項1記載の遺伝子発現方法。

【請求項4】 オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターが、ピルビン酸デカルボキシラーゼ1遺伝子のプロモーターである請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子発現方法。

【請求項5】 生育に必須ではない遺伝子のプロモーターが、チオレドキシンをコードする遺伝子のプロモーターである請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子発現方法。

【請求項6】 宿主生物が、細菌、酵母、昆虫、動物又は植物である請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子発現方法。

【請求項7】 酵母がサッカロマイセス属に属するものである請求項6記載の遺伝子発現方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、宿主生物に遺伝子工学的手法を用いて遺伝子を導入し発現させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 宿主生物において物質生産を行ったり、宿主生物の機能の改変又は分析を行う場合には、宿主生物に同種又は異種遺伝子を導入し発現させる遺伝子工学的手法が用いられている。しかしながら、この遺伝子工学的手法は、安定性及び高発現の点でまだ十分なものではなく、改善が望まれている。

【0003】 例えば、宿主生物が酵母サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の場合、2 μm DNAを利用したYPEタイプのベクターがよく用いられている。YPEベクターは、多数コピーの遺伝子を導入することができるが、細胞分裂に伴いベクターの脱落など

によりその酵素活性が低下することがあるため安定性の点で十分とはいえない。酵素活性を向上させるためにには、ベクターに薬剤耐性マーカーを含有させ、培地にこの薬剤を添加するか、又は、宿主株にあらかじめ栄養要求性マーカーが付与されている場合には、栄養要求性マーカーをベクターに含むよう設計を行い、さらに培地として高度に精製した最小培地 (YNB, Difco社製) を利用することによって選択圧を加えることができるが、いずれの場合についても培地コストは高額になってしまうと10いう問題点がある。

【0004】 一方、染色体導入型ベクターとしては、相同組換えを利用したYIPベクターが知られている。このYIPベクターは、ベクターの設計によっては、導入遺伝子を安定的にゲノム上に存在させることができるが、一般的には導入遺伝子を高発現させることはできない。以上のような理由から、当技術分野では、安定的かつ低コストで宿主生物に遺伝子を導入し、高発現させる方法が望まれていた。

【0005】

【0005】 【発明が解決しようとする課題】 本発明は、宿主生物に安定的に目的遺伝子を導入し、高発現させる方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、酵母サッカロマイセス・セレビシエ中のピルビン酸デカルボキシラーゼ1プロモーターに発現させたい目的遺伝子を連結し、これを宿主のゲノムに導入することにより、該目的遺伝子を安定的に高発現させ得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】 すなわち、本発明は、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーター、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの制御下に目的遺伝子をゲノムに導入することを特徴とする遺伝子発現方法である。上記プロモーターは、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターの塩基配列、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの塩基配列において1～40個の塩基が欠失、置換若しくは付

加された配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNAであってもよい。また上記プロモーターは、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターの塩基配列、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの塩基配列の全部若しくは一部の配列に相補的な配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロモーター活性を有するDNAであってもよい。

【0008】 本発明において、上記オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターとしては、ピルビン酸デカルボキシラーゼ1遺伝子のプロモーターが

挙げられ、生育に必須ではない遺伝子のプロモーターとしては、チオレドキシンをコードする遺伝子のプロモーターが挙げられる。この場合、宿主生物は、細菌、酵母、昆虫、動物又は植物のいずれでもよく、特にサッカロマイセス属に属する酵母が好ましい。これらの宿主生物は、生物個体（ヒトを除く）、組織、細胞のいずれをも意味する。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。生物界には、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子や、生育及び発酵に必須ではない遺伝子が存在する。本発明者らはこの点に着目し、遺伝子の導入及び発現方法において、このような遺伝子のプロモーターを選択した。従って、本発明の遺伝子発現方法は、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターの制御下に、あるいは宿主生物において生育又は発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの制御下に目的遺伝子をゲノムに導入することを特徴とする。本発明の方法の概要は以下の通りである。

【0010】1. プロモーターの選択

まず、オートレギュレーション機構の存在する遺伝子のプロモーター、又は宿主生物の生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターを選択する。対象となる宿主生物としては、物質生産及び機能改変又は機能分析が望まれるあらゆる生物を宿主生物として用いることができる。例えば、細菌、酵母、昆虫、動物、又は植物などが挙げられる。

【0011】(1) オートレギュレーション機構が存在する遺伝子プロモーター

オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターを選択するには、まず、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子を特定する。「オートレギュレーション機構」とは、同じ機能を有する遺伝子が同一生物において複数存在し、通常、そのうちの少なくとも1つは発現しているが、残りの遺伝子は抑制されており、通常発現している遺伝子が破壊などにより機能しなくなつた場合にのみ、残りの遺伝子が発現されてその機能を継続する機構を意味する。例えば、サッカロマイセス属に属する酵母のピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子(PDC)は、エタノールを生産する過程においてピルビン酸を脱炭酸してアセトアルデヒドに変換する酵素をコードする遺伝子であり、発酵過程で重要な役割を果たしている。PDCには、PDC1、PDC5及びPDC6が存在するが、通常はPDC1が機能しており、PDC5及びPDC6はPDC1の働きによって抑制されている。しかしながら、遺伝子破壊や薬剤による変異をこのPDC1に与えてPDC1の機能を不活性化させた場合には、PDC5遺伝子が活性化され、それにより酵母のエタノール生産機能は失われない。すなわち、生理的な表現系は親株とほぼ同等となる。

【0012】オートレギュレーション機構が存在する遺

伝子は、ある遺伝子を破壊した株において、遺伝子産物であるタンパク質が依然として発現されているかどうかを確認することにより特定することができる。このようにして特定されたオートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターを選択する。本発明においては、例えば、PDC1のプロモーター（以下、PDC1プロモーターと呼ぶ。）を選択することができる。

【0013】(2) 生育又は発酵に必須ではない遺伝子のプロモーター

- 10 宿主生物の生育又は発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターを選択するには、まず、生育又は発酵に必須ではない遺伝子を特定する。ここで、「生育」とは菌体が増殖できるように生存していることを意味し、「発酵」とはアルコール発酵等の物質を生産することを意味する。
- 15 そして、「必須ではない遺伝子」とは、当該遺伝子を破壊又は不活性化しても依然として生育若しくは発酵又はこれらの両者が維持され、これらの生育及び発酵とは無関係の遺伝子を意味する。

【0014】生育又は発酵に必須ではない遺伝子は、ある遺伝子を破壊した株において、宿主生物が生育及び発酵を継続するかどうかを確認することにより特定することができる。このような遺伝子としては、例えば、大部分の生物に存在するチオレドキシンをコードするTRX1遺伝子が挙げられる。このTRX1遺伝子は、DNA複製、酸化的ストレス応答、液胞遺伝などに関与しているが、生育又は発酵に必ずしも必須ではない。すなわち、宿主生物においてTRX1遺伝子を破壊又は置換しても、宿主生物は生育又は発酵を継続することができる。このようにして特定された宿主生物の生育又は発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターを選択する。

- 20 25 30

【0015】2. 目的遺伝子及びプロモーターの調製
宿主生物に導入する上記選択したプロモーターと目的遺伝子を調製する。本発明において、「目的遺伝子」とは、物質生産及び機能改変又は機能分析のために発現させることが望まれる遺伝子を意味し、同種遺伝子又は異種遺伝子のいずれでもよい。例えば物質生産を目的とする場合、目的遺伝子としては有用なタンパク質をコードする遺伝子が好ましく、そのような有用タンパク質としては、例えば、インターフェロン、ワクチン、ホルモンなどが挙げられる。また、目的遺伝子は、酵素をコードする遺伝子であってもよく、例えばピルビン酸から乳酸を生成する乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子などが挙げられる。

- 35 40 45 50

【0016】目的遺伝子及び上記プロモーターの調製は、当技術分野で周知の任意の手法を採用することができる。例えば、目的遺伝子及び上記プロモーターを供与源から単離する場合には、グアニジンイソチオシアネート法により調製されたRNAからcDNAを合成する方法により調製することができる。また、PCRによりゲノムDNAを鑄型として增幅することにより調製することも可能であ

る。このようにして得た目的遺伝子及び上記プロモーターのDNAは、目的によりそのまま、又は所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加することにより使用することができる。

【0017】本発明においては、プロモーターの塩基配列において1～40個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、かつプロモーター活性を有するDNAもまたプロモーターとして利用可能である。プロモーター活性とは、プロモーターの下流に発現可能な状態で目的遺伝子を連結し、宿主に導入した際、宿主内又は宿主外において目的遺伝子の遺伝子産物を生産させる能力及び機能を有することをいう。このようなDNAは、変異

(欠失、置換若しくは付加)を有しない完全長の塩基配列からなるプロモーターが機能する条件と同一の条件でほぼ同様の利用が可能な程度のプロモーター活性が維持されていることをいう。例えば、完全長の配列のプロモーター活性の約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍の活性を維持するDNAである。

【0018】このようなDNAは、Molecular Cloning (Sambrookら編(1989) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) 等の文献の記載に従って製造することができる。例えば、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーターの塩基配列、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの塩基配列を基にして、当該塩基配列から1～40個の塩基の欠失、置換若しくは付加を人為的に行う技術、例えば部位特異的突然変異誘発法により、プロモーター活性を維持しつつ配列の異なる変異体を作製することができる。例えば1～40個の塩基が置換されるような部位特異的突然変異誘発については、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(1984) 5662-5666; WO85/00817号公報; Nature 316(1985) 601-605; Gene 34(1985) 315-323; Nucleic Acids Res. 13(1985) 4431-4442; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79(1982) 6409-6413; Science 224(1984) 1431-1433等に記載の技術に従って変異体を取得し、これを利用することができる。また、市販のキット (Mutan-G, Mutan-K (宝酒造)) を用いてこれらの変異体を作製することができる。さらに、誤りを起こしやすいポリメラーゼ連鎖反応 (error-prone PCR) もまた変異体作製方法として知られており、複製の厳密度の低い条件を選択することによって1～数塩基の変異を導入することができる (Cadwell, R.C. and Joyce, G.F. PCR Methods and Applications 2(1992) 28-33; Malboeuf, C.M. et al. Biotechniques 30(2001) 1074-8; Moore, G.L. and Maranas C.D. J. Theor. Biol. 7; 205 (2000) 483-503)。

【0019】また、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーター、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの塩

基配列の全部又は一部に相補的な配列からなるDNAをプロープ (100～900塩基) として用いてストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせることによって、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーター

05 一、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの塩基配列からなるDNAと同様の機能 (すなわちプロモーター活性) を有する他の塩基配列からなるDNAを新たに取得し、利用することもできる。ここで、ストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度が、10～300mM、好ましくは20～100mMであり、温度が25～70°C、好ましくは42～55°Cにおける条件をいう。

【0020】上記のように取得した変異体やハイブリダイゼーションにより得られるDNAがプロモーターとしての活性を有するか否かは、以下のような手法により確認することができる。すなわち、上記のようにして得られるDNAのプロモーター活性は、好ましくは種々のレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子 (LUC) 、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (CAT) 、 β ガラクトシダーゼ遺伝子 (GAL) 等をプロモーターの下流域に連結したベクターを作製し、当該ベクターを用いて宿主のゲノムに導入した後、当該レポーター遺伝子の発現を測定することにより確認することができる。

20 25 【0021】3. 目的遺伝子及びプロモーターの導入 続いて、上記オートレギュレーション機構が存在する遺伝子、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子を破壊し、この遺伝子のプロモーターの制御下に目的遺伝子を導入するか、あるいはこの遺伝子を目的遺伝子と置換する。

【0022】例えば、上述のようにして単離した目的遺伝子と上記選択したプロモーターとを機能可能な形で連結して宿主生物のゲノムに導入する。「機能可能な形で連結する」とは、目的遺伝子が導入される宿主生物において上記プロモーターの制御下に目的遺伝子が発現されるように、目的遺伝子と上記プロモーターとを連結することを意味する。目的遺伝子及び上記プロモーターの導入は、当技術分野で公知のあらゆる手法を用いて行うことができる。例えば、組換えベクターを用いて目的遺伝子及び上記プロモーターを宿主生物のゲノムに導入することができる。組換えベクターは、適当なベクターに目的遺伝子及び上記プロモーターを連結 (挿入) することにより得ることができる。目的遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主生物中のゲノムに組み込み可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ベクテリオファージDNA、レトロトранスポゾンDNA、酵母人工染色体DNA (YAC: yeast artificial chromosome) などが挙げられる。

40 45 【0023】プラスミドDNAとしては、例えばpRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pAUR101又はpAUR135などのYI

p型大腸菌-酵母シャトルベクター、大腸菌由來のプラスミド (pBR322、pBR325、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pTV118N、pTV119N、pBluescript、pHSG298、pHSG396 又はpTrc99AなどのColE系プラスミド、pACYC177又はpACYC184などのp15A系プラスミド、pMW118、pMW119、pMW218又はpMW219などのpSC101系プラスミド等)、枯草菌由來のプラスミド (例えばpUB110、pTP5等)などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ (Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP)、φX174、M13mp18又はM13mp19などが挙げられる。レトロトランスポゾンとしては、Ty因子などが挙げられる。YAC用ベクターとしてはpYAC2などが挙げられる。ベクターに目的遺伝子及び上記プロモーターを挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

【0024】目的遺伝子は、上記選択されたプロモーターの制御下にてその遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、組換えベクターには、上記選択されたプロモーター、目的遺伝子、ターミネーターのほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、リボソーム結合配列 (SD配列)などを連結することができる。また、ベクターが細胞内に保持されていることを示す選択マーカーを連結してもよい。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。その他、マーカー遺伝子としてトリプトファン合成遺伝子 (TRP1遺伝子) が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、他のマーカー遺伝子、例えば、栄養要求性能を持つURA3遺伝子、ADE2遺伝子、HIS3遺伝子、又は薬剤耐性能を持つG418耐性遺伝子も利用可能である。

【0025】ターミネーター配列としては、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドログナーゼ遺伝子 (GAPDH) のターミネーター遺伝子が挙げられるが、本発明はこれに限定されるものではなく、宿主生物内で使用可能なターミネーター配列であればいかなるものを使用してもよい。

【0026】以上のようにして宿主生物における目的遺伝子の発現に適合するように組換えベクターを作製することができる。この組換えベクターを用いて宿主生物を形質転換することにより、宿主生物において上記選択したプロモーターの制御下にて目的遺伝子を発現させることができる。

【0027】大腸菌などの細菌を宿主とする場合は、組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、目的遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。ま

た、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0028】大腸菌としては、例えばエッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12、DH1などが挙げられ、枯草5菌としては、例えばバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法などが挙げられる。

【0029】酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法などが挙げられる。

【0030】昆虫又は動物を宿主とする場合、組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。植物を宿主とする場合、組換えベクターの導入方法としては、例えばアグロバクテリウム法、ペーティクルガン法、PEG法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

【0031】昆虫、動物（ヒトを除く）又は植物の個体を宿主とする場合には、当技術分野で公知のトランスジェニック動物又は植物の作製手法に従って組換えベクターを導入することができる。例えば、動物個体への組換えベクターの導入方法としては、受精卵へのマイクロインジェクション法、ES細胞へ導入する方法、培養細胞へ導入した細胞核を核移植により受精卵に導入する方法などが挙げられる。

【0032】上述のように組換えベクターを導入した宿35主生物は、目的遺伝子が上記選択されたプロモーターの制御下に導入されている株について選択を行う。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換株を選択する。目的遺伝子が上記プロモーター制御下に組み込まれたか否かの確認は、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法、ザザンハイブリダイゼーション法により行うことができる。例えば、形質転換株からDNAを調製し、導入DNA特異的プライマーを設計してPCRを行う。その後、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリラルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動などを行45い、臭化エチジウム、SYBR Green液などにより染色し、そして増幅産物を1本のバンドとして検出することにより、導入DNAを確認することができる。また、予め蛍光色素などにより標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレートなどの固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は50

酵素反応などにより増幅産物を確認する方法も採用することができる。

【0033】上述のようにして、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーター、又は宿主生物の生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターの制御下に目的遺伝子がゲノムに導入され（ゲノムインテグレーション）、宿主生物において目的遺伝子が発現される。PDC1プロモーターは非常に強力なプロモーターであるため、PDC1プロモーターを選択した場合には、目的遺伝子がゲノムにシングルコピーで導入されても、高発現されることになる。また、選択したプロモーターの元の遺伝子は生育及び発酵に必須ではないため、破壊又は目的遺伝子と置換されても、宿主生物は生育及び発酵を継続することができ、目的遺伝子を長期にわたって発現することができる。

【0034】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】ベクターの構築

本実施例においては、サッカロマイセス・セレビシエ由来のピルビン酸デカルボキシラーゼ1遺伝子（PDC1遺伝子）プロモーター配列の制御下で、目的遺伝子としてビフィドバクテリウム・ロンガム（*Bifidobacterium longum*）由来のラクトートデヒドログナーゼ遺伝子（LDH遺伝子）を使用した。

【0035】本実施例のために新たに構築した染色体導入型ベクターをpBTRP-PDC1-LDHと名付け、以下に本ベクター構築例の詳細を記す。なお本実施例の概要を図1に示す。但し、ベクター構築の手順はこれに限定されるものではない。ベクターの構築にあたって、必要な遺伝子断片であるPDC1遺伝子のプロモーター断片（PDC1P）971bpと、PDC1遺伝子下流領域断片（PDC1D）518bpは、サッカロマイセス・セレビシエ YPH株（Stratagene社）のゲノムDNAを鑄型として使用したPCR増幅法によって単離を行った。

【0036】サッカロマイセス・セレビシエ YPH株のゲノムDNAは、ゲノム調製キットであるFast DNA Kit (Bio 101社) を用い、詳細は付属のプロトコールに従い、調製した。DNA濃度は分光光度計Ultro spec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech社) にて測定した。

【0037】PCR反応には、増幅酵素として、増幅断片の正確性が高いとされるPyrobest DNA polymerase（宝酒造社）を使用した。上記手法にて調製したサッカロマイセス・セレビシエ YPH株のゲノムDNA 50ng/サンプル、プライマー-DNA 50pmol/サンプル、及びPyrobest DNA polymerase 0.2ユニット/サンプルを合計で50μlの反応系に調製した。反応溶液を、PCR増幅装置Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems社) によってDNA増幅を行った。PCR増幅装置の反応条件は、96℃ 2分の

後、(96℃ 30秒→55℃ 30秒→72℃ 90秒) を25サイクル行い、その後4℃とした。PDC1P増幅断片とPDC1D増幅断片を1%TBEアガロースゲル電気泳動にて遺伝子増幅断片の確認を行った。なお反応に使用したプライマー-DNAは、合成DNA（サワーデーテクノロジー社）を用い、このプライマーのDNA配列は以下の通りである。

【0038】PDC1P断片の増幅

・PDC1P-LDH-U (31mer, Tm値58.3℃) 末端に制限酵素Bam HIサイトを付加：ATA TAT GGA TCC GCG TTT ATT TAC CT

10 A TCT C. (配列番号1)

・PDC1P-LDH-D (31mer, Tm値54.4℃) 末端に制限酵素Eco RIサイトを付加：ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT G AC TGT G (配列番号2)

PDC1D断片の増幅

15 ・PDC1D-LDH-U (34mer, Tm値55.3℃) 末端に制限酵素Xba Iサイトを付加：ATA TAT CTC GAG GCC AGC TAA CTT CT T CGT CGA C (配列番号3)

・PDC1D-LDH-D (31mer, Tm値54.4℃) 末端に制限酵素Apa Iサイトを付加：ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GA

20 C TGT G (配列番号4)

【0039】上記反応にて取得したPDC1P及びPDC1D各遺伝子増幅断片をそれぞれ、エタノール沈殿処理によって精製した後、PDC1P増幅断片を制限酵素BamHI/EcoRI及びPDC1D増幅断片を制限酵素XbaI/ApaIにて制限酵素反応処理を行った。なお以下に用いた酵素類はすべて宝酒造社製のものを用いた。また、エタノール沈殿処理、制限酵素処理の一連操作の詳細なマニュアルはMolecular Cloning A Laboratory Manual second edition (Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory press. 1989) に従った。

【0040】ベクターの構築における一連の反応操作は、一般的なDNAサブクローニング法に準じて行った。すなわち、制限酵素BamHI/EcoRI（宝酒造社）及び脱リン酸化酵素Alkaline Phosphatase (BAP、宝酒造社) を施したpBluescriptII SK+ベクター（東洋紡社）に、上記PCR法にて増幅し、制限酵素処理を施したPDC1P断片をT4DNA Ligase反応によって連結させた（図1A）。T4 DNA Ligase反応には、LigaFast Rapid DNA Ligation System (プロメガ社) を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。

【0041】次にLigation反応を行った溶液を、コンピテント細胞へ形質転換を行った。コンピテント細胞は大腸菌JM109株（東洋紡社）を用い、詳細は付属のプロトコールに従って行った。得られた培養液は抗生物質アンピシリン100μg/mlを含有したLBプレートにまいて一晩培養した。生育したコロニーを、インサート断片のプライマー-DNAを用いたコロニーPCR法による確認、及びミニプレップによるプラスミドDNA調製溶液を、制限酵素処理による確認を行い、目的とするベクター-pBPDC1Pベクターを単離した（図1B）。

【0042】ついでトヨタ自動車(株)によって構築されたpYLD1ベクターを制限酵素EcoRI/AatII処理及び末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理することで得られるLDH遺伝子断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベクター中に、上述と同様の操作でサブクローニングを行い、pBPDC1P-LDH Iベクターを作製した(図1C)。なお、上記のpYLD1ベクターは大腸菌に導入され(名称:「*E. coli* pYLD1」)、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1)に、受託番号FERM BP-7423としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている(原寄託日:平成11(1999)年10月26日)。続いてこのベクターをXbaI/ApaI処理し、増幅したPDC1D断片を連結させてpBPDC1P-LDH IIベクターを作製した(図2A)。最後にpBPDC1P-LDH IIベクターをEcoRV処理したものに、pRS404ベクター(Stratagene社)をAattII/SspI処理、T4 DNA polymerase処理して得られたTRP1マーカー断片を連結させて、最終コンストラクトである染色体導入型pBTRP-PDC1-LDHベクターを構築した(図2B)。

【0043】構築した染色体導入型pBTRP-PDC1-LDHベクターの確認の為に塩基配列決定を行った。塩基配列解析装置としてABI PRISM 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems社)を使用し、試料の調製法、及び機器の使用方法などの詳細は本装置付属のマニュアルに従つた。試料となるベクターDNAはアルカリ抽出法により調製したもの用い、これをGFX DNA Purification kit(Amersham Pharmacia Biotech社)にてカラム精製した後、分光光度計Ultro spec 3000(Amersham Pharmacia Biotech社)にてDNA濃度を測定したものを用いた。また、比較対照として、PDC1プロモーター制御下に乳酸生産遺伝子であるLDH(ラクテートデヒドロゲナーゼ)が導入されるようYIPベクターの構築を行った。

LDH導入法の違いと継代培養による乳酸生産量の比較

LDH導入法	継代培養前	継代培養後
①親株(LDH非存在)	0%	-
②YEPベクターによるLDH導入	0.4%	0%
③PDC1プロモーター制御下でのLDH導入	1.0%	1.0%

【0049】ベクター非導入株■では乳酸を作らないのに対して、LDHを導入した■及び■では乳酸を生産していた。さらにYEPベクターで導入した■に比べ、PDC1プロモーター制御下にLDHを導入した株では2.5倍の乳酸を生産していた。また、本方法により導入した形質の安定性を確認することを目的として、YPDプレートで3回の継代培養を行った後に、PCRにより遺伝子導入と乳酸生産量について調べたところ、YEPベクターで導入した系■では乳酸を生産しなくなっていたのに対し、PDC1プロモーター制御下でLDHを発現させた■では継代培養前と同量の乳酸生産が維持されていた。また、PCRでゲノム

【0044】[実施例2]組換えベクターの宿主への導入

宿主である酵母IF02260株(社団法人・発酵研究所に登録されている菌株)のトリプトファン要求株は、10mlYPD培地にて30℃で対数増殖期まで培養を行い、集菌及びTEバッファーによる洗浄を行った後、0.5mlTEバッファーと0.5ml、0.2M酢酸リチウムを加え、30℃にて1時間振盪培養を行った。その後、制限酵素ApaI及びSpeIで処理したpBTRP-PDC1-LDHを加えた。

【0045】このプラスミドの菌懸濁液を30℃で30分間振盪培養後、70%ポリエチレングリコール4000を150ml加え、よく攪拌した。30℃にて1時間振盪培養した後、42℃にて5分間ヒートショックを与えた。菌体を洗浄した後、200mlの水に懸濁したものを選択培地に塗抹した。

【0046】得られたコロニーを選択培地で単離し、コロニーを得た後、PCRにてPDC1プロモーターの下流にLDHが導入されている株を取得した。更に、胞子形成培地で胞子形成を行い、またホモタリック性を利用して2倍体化を行つて、2倍体である染色体両方に上記ベクターが導入されている株を取得した。酵母サッカロマイセ・セレビシエが図2に示したpBTRP-PDC1-LDHで形質転換され、ゲノム上に導入されたことをPCRで確認した。上記ベクターのゲノム上の構造を図3に示す。

【0047】[実施例3] LDH遺伝子の発現及び安定性の確認

得られた形質転換体について、YPD液体培地(グルコース10%)に菌体濃度が1%になるように接種して、30℃にて2日間静置培養を行い、■ベクター非導入株、■YEPベクターでのLDH導入株、及び■pBTRP-PDC1-LDH導入株の30乳酸生産量について比較検討を行つた。この結果を表1に示す。

【0048】

【表1】
LDH導入法の違いと継代培養による乳酸生産量の比較

40 上の構造について変化のないことを確認したことから、■のPDC1プロモーター制御下でLDHを発現させる系は、安定に存在し、遺伝子を高発現させるといえる。

【0050】[実施例4] 変異配列を含むPDC1プロモーター配列の単離

45 本実施例及び以下の実施例においては、数塩基の異なる配列をもつ3種類のPDC1プロモーター配列を単離し、本プロモーター下にLacZ遺伝子が連結するよう設計した染色体導入型ベクターを構築した。これらのベクターを用いて、染色体中の同一の位置に該プロモーターと該遺伝子を1コピー導入して形質転換酵母を作製した。それぞ

れの形質転換酵母の β -ガラクトシダーゼ活性を測定し、3種類のプロモーター活性を比較した。

【0051】本実施例においては、サッカロマイセス・セレビシエ pBTRP-PDC1-LDH導入株（実施例2で作製した菌株）、IF02260株（社団法人・発酵研究所に登録されている菌株）及びYPH株（Stratagene社）のゲノムDNAを鋳型として使用したPCR増幅法によってPDC1プロモーター配列の単離を行った。各サッカロマイセス・セレビシエ（pBTRP-PDC1-LDH導入株、IF02260株、YPH株）のゲノムDNAの調製方法及びPCR増幅法は、実施例1と同様の手法にて行った。なお反応に使用したプライマーDNAの塩基配列は以下の通りである。

【0052】pBTRP-PDC1-LDH導入株由来のPDC1プロモーターの増幅

- ・PDC1 PrFrag-U2 (32mer, Tm値64.4°C) 末端に制限酵素SalIサイトを付加：AAA TTT GTC GAC AAG GGT AGC CT C CCC ATA AC (配列番号5)
- ・PDC1 PrFrag-D2 (31mer, Tm値61.1°C) 末端に制限酵素SalIサイトを付加：ATA TAT GTC GAC GAG AAT TGG GG G ATC TTT G (配列番号6)

IF02260株及びYPH株由来のPDC1プロモーターの増幅

- ・PDC1 PrFrag-U2 (32mer, Tm値64.4°C) 末端に制限酵素SalIサイトを付加：AAA TTT GTC GAC AAG GGT AGC CT C CCC ATA AC (配列番号5)
- ・PDC1 PrFrag-D (43mer, Tm値62.5°C) 末端に制限酵素SalIサイトを付加：TTT AAA GTC GAC TTT GAT TGA TTT GAC TGT GTT ATT TTG CGT G (配列番号7)

【0053】【実施例5】変異プロモーター配列を含む、 β -ガラクトシダーゼ解析用ベクターの構築

本実施例においては、単離した3種類のPDC1プロモーター配列の制御下で、レポーター遺伝子を連結したベクターを構築した。レポーター遺伝子として、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（LacZ遺伝子）を使用した。

【0054】本実施例のために新たに構築した染色体導入型ベクターを、pAUR-LacZ-T123PDC1、pAUR-LacZ-OC2P DC1及びpAUR-LacZ-YPHPDC1と名付け、以下にベクターの構築例の詳細を記す。なお本実施例の概要を図4に示す。但し、ベクター構築の手順はこれに限定されるものではない。

【0055】ベクターの構築における一連の反応操作は、一般的なDNAサブクローニング法に従った。プロメガ社pSV- β -Galactosidase Control Vectorを制限酵素で切り出し、LacZ断片を取得した後、平滑末端処理してpAUR-LacZベクターを作製した。こうして構築されたpAUR-LacZベクターに、SalI（宝酒造）処理、および脱リン酸化酵素Alkaline Phosphatase (BAP、宝酒造) 処理を行った。次に、実施例4において取得した3種類のプロモーター配列、すなわちpBTRP-PDC1-LDH導入株由来PDC1プロモーター（983bp）、IF02260株由来PDC1プロモーター（968bp）、及びYPH株由来PDC1プロモーター（968b

p）を、それぞれ制限酵素SalI（宝酒造）にて制限酵素処理を行い、pAUR-LacZベクター中に、T4 DNA Ligase反応によって連結させた。T4 DNA Ligase反応には、LigaFast Rapid DNA Ligation System（プロメガ社）を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。

【0056】得られたLigation反応溶液を用いて、コンピテント細胞へ形質転換を行い、コロニーパーク法によって、目的とする構築ベクターを取得した。上記一連の操作は実施例1と同様の手法にて行った。

【0057】構築したベクターについて塩基配列解析を行い、pBTRP-PDC1-LDH導入株由来PDC1プロモーター（983bp）、IF02260株由来PDC1プロモーター（968bp）、及びYPH株由来PDC1プロモーター（968bp）の遺伝子配列を比較した。本配列の比較を図5に示す。なお塩基配列解析の操作は実施例1と同様の手法にて行った。

【0058】pBTRP-PDC1-LDH導入株由来PDC1プロモーター（983bp）は、実施例1において取得したPDC1プロモーター配列（971bp）とは12塩基異なるものであり、具体的には、実施例1のプロモーター配列の両末端に制限酵素SalI部位（GTCGAC）が付加された配列で構成されている。

【0059】またIF02260株由来PDC1プロモーター（968bp）は、実施例1において取得したPDC1プロモーター配列とは30塩基異なるものであり、具体的には、実施例1のプロモーター配列の861番目のグアニン（G）がシトシン（C）に、894番目のシトシン（C）がチミン（T）に、925番目のアデニン（A）がチミン（T）に置換されており、また972番目以降に15塩基の配列（GAT CCCCAATTCTC）が付加されている。またさらに、実施例30のプロモーター配列の両末端に制限酵素SalI部位（GT CGAC）が付加された配列で構成されている。

【0060】YPH株由来PDC1プロモーター（968bp）は、実施例1において取得したPDC1プロモーター配列とは37塩基異なるものであり、具体的には、実施例1のプロモーター配列の179番目のシトシン（C）がチミン（T）に、214番目のアデニン（A）がグアニン（G）に、216番目のグアニン（G）がアデニン（A）に、271番目のチミン（T）がシトシン（C）に、344番目のグアニン（G）がアデニン（A）に、490番目のアデニン（A）

がグアニン（G）に、533番目のシトシン（C）がチミン（T）に、566番目のチミン（T）がシトシン（C）に、660番目のグアニン（G）がシトシン（C）に、925番目のアデニン（A）がチミン（T）に置換されており、また972番目以降に15塩基の配列（GATCCCCCAATTCTC）が付加されている。またさらに、実施例1のプロモーター配列の両末端に制限酵素SalI部位（GTCGAC）が付加された配列で構成されている。

【0061】【実施例6】組換えベクターの宿主への導入
宿主である酵母IF02260株（社団法人・発酵研究所に登

録されている菌株) のトリプトファン要求株に、10ml YPD培地にて30℃で対数増殖期まで培養を行い、集菌およびTEバッファーによる洗浄を行った後、0.5ml TEバッファーと0.5mlの0.2M酢酸リチウムを加え、30℃にて1時間の振盪培養を行った。その後、制限酵素Bst1107I (宝酒造) で処理したpAUR-LacZ-T123PDC1P、pAUR-LacZ-YPHPD C1P、pAUR-LacZ-OC2PDC1Pを加えた。

【0062】このプラスミドの懸濁液を30℃で30分間振盪培養後、70%ポリエチレンリコール4000を150μl加え、よく攪拌した。本溶液を30℃にて1時間振盪培養した後、42℃にて5分間ヒートショックを与え、本菌体を1mlYPD培地にて30℃で12時間培養を行った。本培養液を洗浄後、200μlの滅菌水に懸濁したものをオーレオバチシン選択培地に塗抹した。培地に添加したオーレオバチシンの濃度は0.4μg/mlとした。得られたコロニーはオーレオバチシン選択培地で単離を行い、得られたコロニーに対してPCR法を行って、目的とする株を取得した。

【0063】[実施例7] 遺伝子組換え菌株におけるβガラクトシダーゼ活性の測定

上記形質転換体と非形質転換体についてβガラクトシダーゼ活性を測定した。各菌株を2mlYPD液体培地(グルコース2%)で、30℃、20時間の培養を行った。これらを集菌し、50mM Tris-HCl 500μlおよびガラスビース(42

5-600microns Acid Washed, SIGMA社) を加え、4℃で15分間ボルテックスを行った。

【0064】遠心によって本溶液の上清を採取し、これらのβガラクトシダーゼ活性測定を測定した。活性測定は、β-Galactosidase Enzyme Assay System(プロメガ社)を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。ABS600nm=1.0当たりの活性値を求め、この結果を図6(継代培養前)及び図7(継代培養後)に示す。

【0065】以上の結果より、数十塩基の付加配列、又は異なる配列をもつPDC1プロモーター配列であっても、安定したプロモーター活性を持つことが明らかとなつた。従って、オートレギュレーション機構が存在する遺伝子のプロモーター、又は宿主生物において生育若しくは発酵に必須ではない遺伝子のプロモーターは、完全長ではなくても利用することができるといえる。

【0066】

【発明の効果】本発明によると、宿主生物の生育及び発酵に影響を及ぼすことなく、遺伝子を安定に導入し、そして高発現させることができる。従って、物質生産、及び機能改変又は機能解析に有効な手段が提供される。

【0067】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Toyota Jidosha Kabushiki Kaisha,
Toyota Central R&D Labs.
<120> Gene Expression System
<130> P02-0112
<150> JP 2001-286637
<151> 2001-09-20
<160> 7
<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
<400> 1

atatatggat ccgcgttat ttacctatct c

31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

atatatgaat tcttgattt atttgactgt g

31

<210> 3

```

<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3
atatatctcg aggcagcta acttcttggt cgac 34
<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
<400> 4
atatatgaat tcttgattg atttgactgt g 31
<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 5
aaatttgcg acaaggtag cctccata ac 32
<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 6
atatatgcg acgagaattt gggatcttt g 31
<210> 7
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer
<400> 7
tttaaagtgc actttgattt atttgactgt gttatatttc gtg 43

```

【0068】

【配列フリーテキスト】

配列番号1：合成DNA

配列番号2：合成DNA

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

配列番号6：合成DNA

配列番号7：合成DNA

【図面の簡単な説明】

【図1】染色体導入型ベクターpBTRP-PDC1-LDHの構築図である。

【図2】染色体導入型ベクターpBTRP-PDC1-LDHの構築図である。

45 【図3】ベクターpBTRP-PDC1-LDHを用いて酵母サッカロマイセス・セレビシエの形質転換を行った場合に得られる株のゲノム構造を示す図である。

【図4】染色体導入型ベクターpAUR-LacZ-T123PDC1
(A)、pAUR-LacZ-OC2PDC1 (B) 及びpAUR-LacZ-YPHD

50 C1 (C) の構築図である。

【図5】 pBTRP-PDC1-LDH導入株由来PDC1プロモーター（983bp）、IF02260株由来PDC1プロモーター（968bp）、及びYPH株由来PDC1プロモーター（968bp）の遺伝子配列の比較を示す図である。

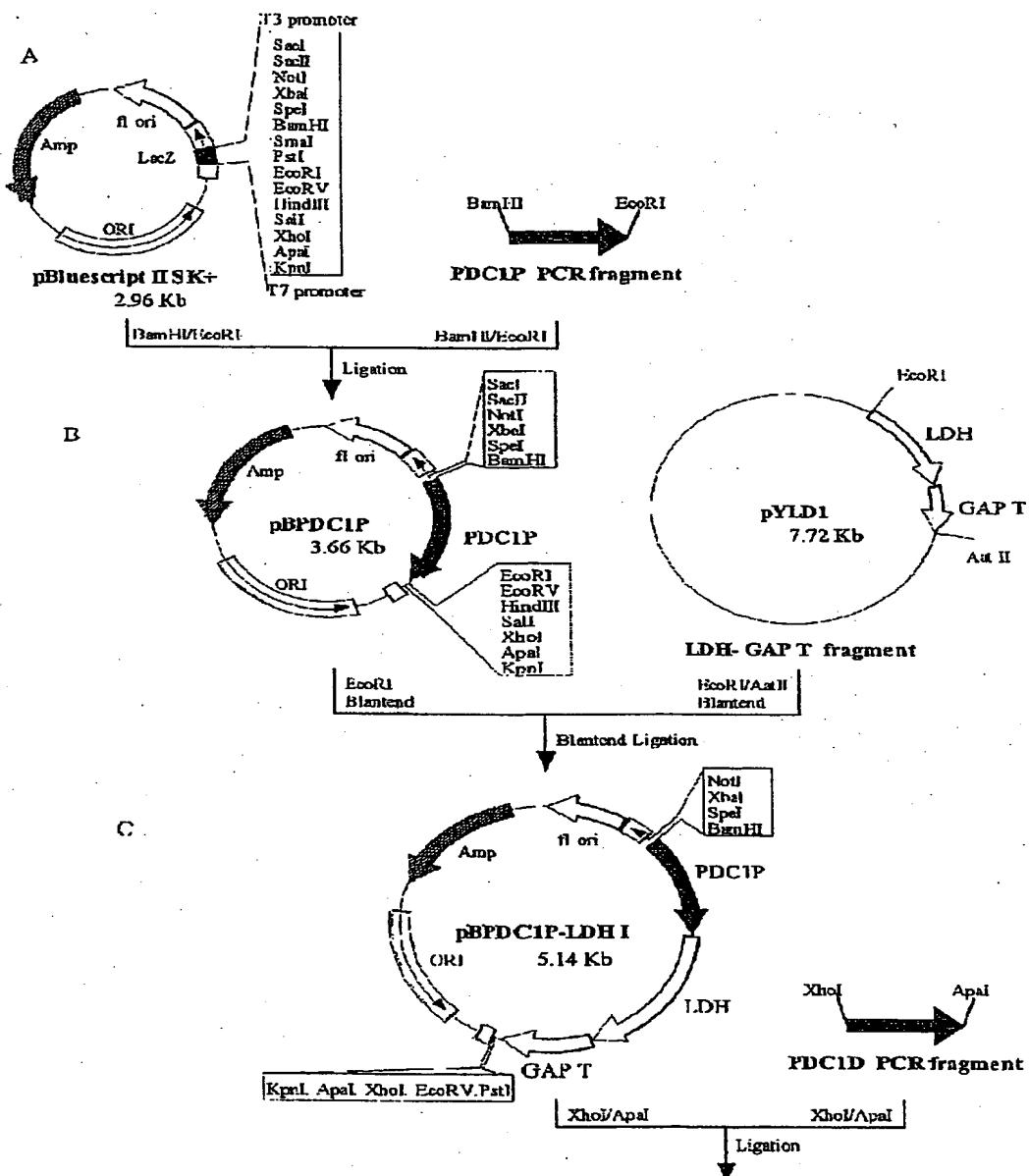
【図6】 pBTRP-PDC1-LDH導入株由来PDC1プロモーター（983bp）、IF02260株由来PDC1プロモーター（968bp）、及びYPH株由来PDC1プロモーター（968bp）を導入

した形質転換体における、継代培養前のβガラクトシダーゼ活性を示す図である。

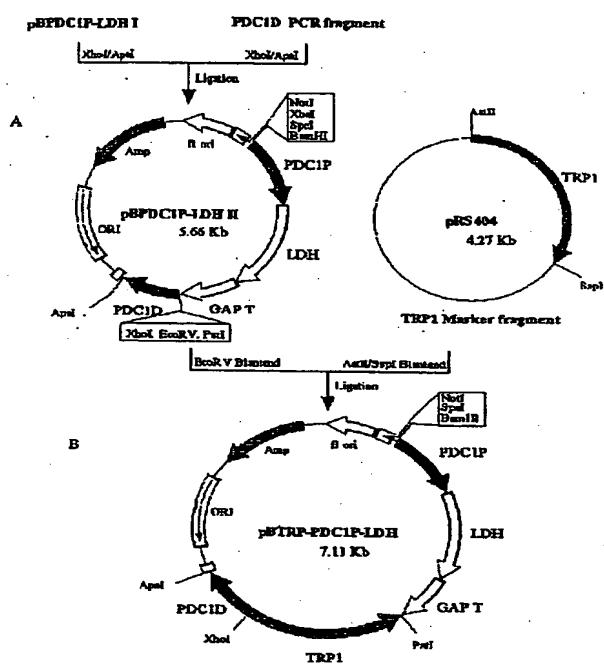
【図7】 pBTRP-PDC1-LDH導入株由来PDC1プロモーター（983bp）、IF02260株由来PDC1プロモーター（968bp）を導入

した形質転換体における、継代培養後のβガラクトシダーゼ活性を示す図である。

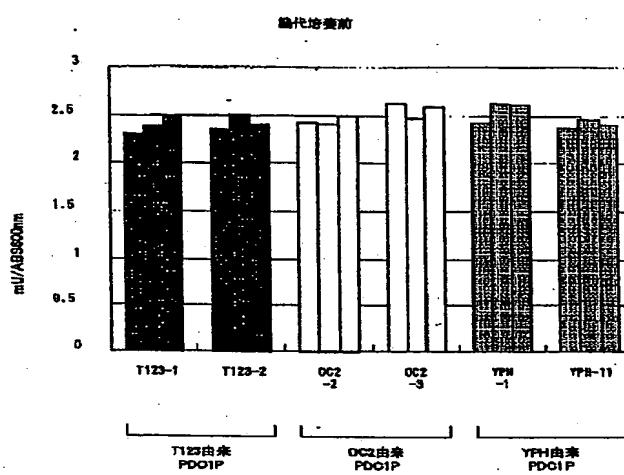
【図1】



【図2】



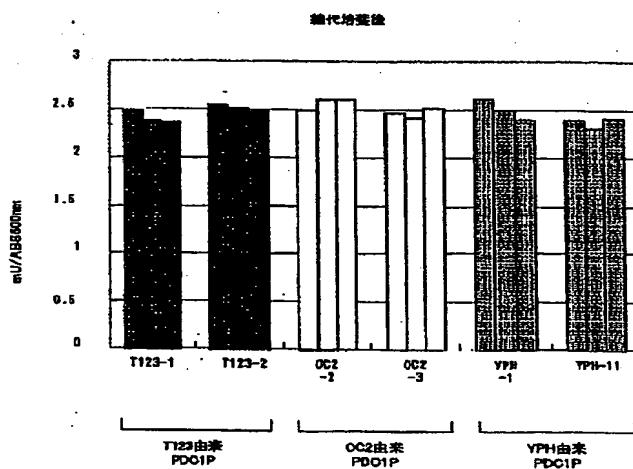
【図6】



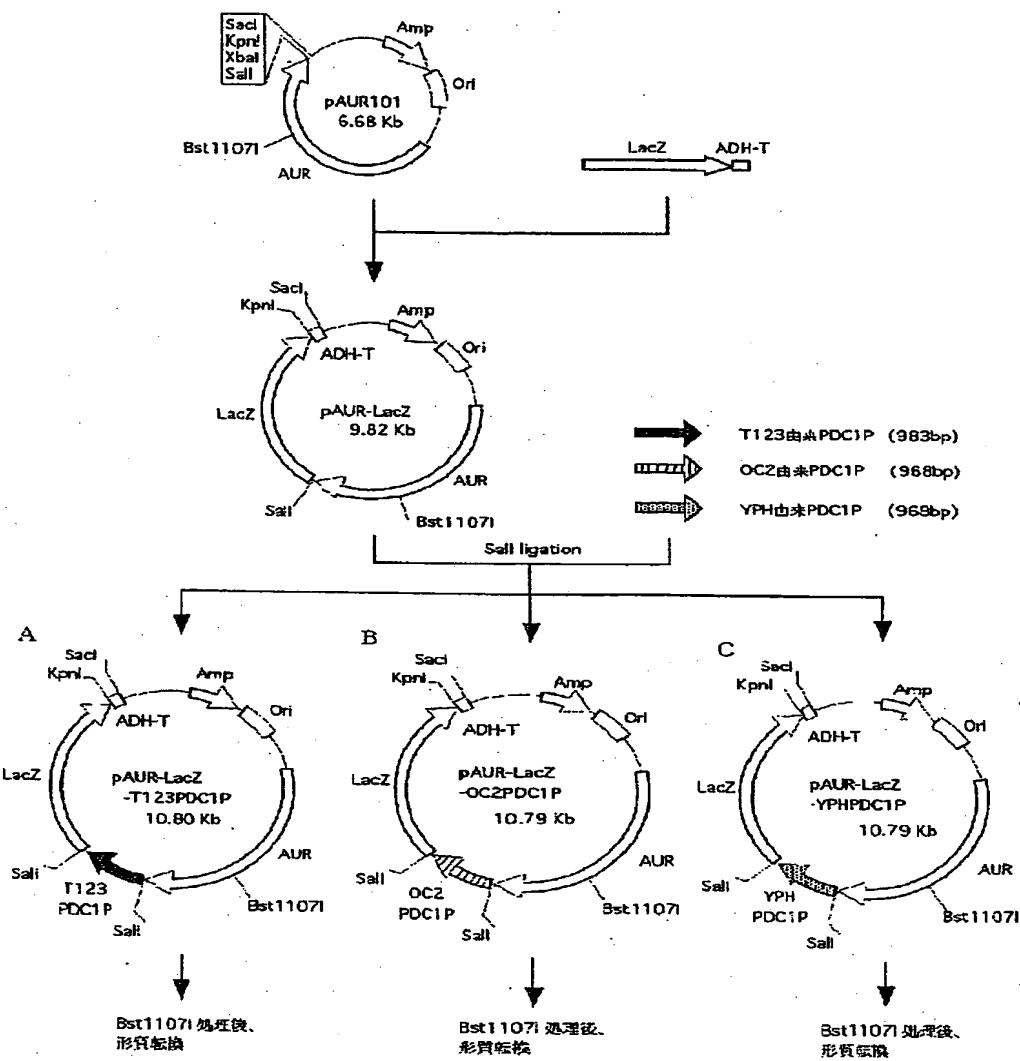
【図3】



【図7】



【図4】



[図5]

[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]

T123-PDC1P	1	GTGCGACAAGGGTAGCTTCCCATAACATTAACCTCAATAAAATATATAGTCCTCAGCTTGAAAGAACAGCTCATGCA	80
OC2-PDC1P	1	80
YFB-PDC1P	1	80
T123-PDC1P	81	AGAGGGTGCTACCCCCACGGCCATATGCATGCAGTACCTATTCAAGTAACTTCACAPACATGTTCAAGGGGAAAC	160
OC2-PDC1P	81	160
YFB-PDC1P	81	160
T123-PDC1P	161	ACACATCGACCTGGGTGAACTATGCTCCGCTGATGTGATGTCAGAGATAACACGCAAGCGAAACCTAACCTTCCTC	240
OC2-PDC1P	161	240
YFB-PDC1P	161	240
T123-PDC1P	241	GGTAAATTAACACACCCCGGCTTTATPTGCCATATCTTAAACTTCACACCTTAAACAPACATGATATTTCTGAGATA	320
OC2-PDC1P	241	320
YFB-PDC1P	241	320
T123-PDC1P	321	ACACACCTGACCCCAACCTTCCCTAAABCGCTAGCPTCCRGTTTGGTGGTTECGGCTTCCTCCGATTCGGCCCG	400
OC2-PDC1P	321	400
YFB-PDC1P	321	400
T123-PDC1P	401	AAATGCATATTTTGTGCTGCCCTGGTGGCATTTGCATAACCTGCTATGCAATTTAARGATCAAGTATGCTCTCTG	480
OC2-PDC1P	401	480
YFB-PDC1P	401	480
T123-PDC1P	481	CTTCTCGCTGTGATGAGCTCGTGGAAATGATTAATGATTAATGAACTTGTGAAAGARCAATTCTGTTGTTACGGTATTTAC	560
OC2-PDC1P	481	560
YFB-PDC1P	481	560
T123-PDC1P	561	ATATGGAATATTCATCAATTGAGGATTTCCTGCATAATTCCTGTTGAAATATTTTCCGACCCCTTGAGTACTTTCTFCAT	640
OC2-PDC1P	561	640
YFB-PDC1P	561	640
T123-PDC1P	641	ATTCGCATATATTCGICCCGCTGGGGTTTTCTGTTACACGGCTGCTTGTATCTACTTCCATCGGTCACACCCACCTTAT	720
OC2-PDC1P	641	720
YFB-PDC1P	641	720
T123-PDC1P	721	TTCTAACTATTTTTTTTGTGCTCATTTGAACTAGCTTAAAGGTGATGSCACATTTTGCAATACCTAGCTGTCCTCGCT	800
OC2-PDC1P	721	800
YFB-PDC1P	721	800
T123-PDC1P	801	GGACATAGGAAARAAATATATTAACACAGGCCTTCAUCCTCCCTGCAATCAGATTGGGTTTCTCCCTTAACTT	880
OC2-PDC1P	801	880
YFB-PDC1P	801	880
T123-PDC1P	881	CATAATTCCTGTCATATTCCTTCTCAATTATTTCTACTCTATAACCAACGSCAAATACACAGTCACATTCATC	960
OC2-PDC1P	881	960
YFB-PDC1P	881	960
T123-PDC1P	961	AGCTCCAAFFCTGGCGAC	983
OC2-PDC1P	961TCCGA	983
YFB-PDC1P	961TCCGA	983

フロントページの続き

(72) 発明者 早乙女 理
愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動
車株式会社内

(72) 発明者 保谷 典子
愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動
車株式会社内

(72) 発明者 松尾 康生
愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

(72) 発明者 石田 直広
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1 株式会社豊田中央研究所内

45 (72) 発明者 平井 正名
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番
地の1 指示会社農田虫害研究所

(72) 発明者 北本 勝ひこ
茨城県牛久市上柏田 3-44-18

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA08 CA04 DA12 EA04
FA02 GA11 GA19 HA03 HA14
4B065 AA21Y AA79X AA80Y AB01
AC14' BA02 CA28